维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)01-0050-03

多药耐药基因（MDR1）转染小鼠骨髓造血细胞表达及功能研究

李英存，金先庆、许嘉陵、康 权，王 珊
（重庆医科大学附属儿童医院普外科 重庆 400014）

【摘 要】目的：探索含人多药耐药基因（MDR1）全长cDNA的逆转录病毒载体转染小鼠骨髓造血细胞转染时间及转染效率的关系。方法：采用逆转录病毒上清法转染小鼠骨髓造血细胞，依据转染时间不同分为2日组及4日组，分别行PCR法检测外源MDR1基因；免疫组化法检测MDR1基因表达，柔红霉素排出试验检测表达外源基因的功能。结果：PCR方法证实转入的外源MDR1基因可整合入小鼠骨髓造血细胞基因组中；免疫组化法检测转染率最高达33%，转染4日组转染率大于转染2日组转染率（$P<0.05$）；柔红霉素排出试验证实转入外源基因表达产物可行使正常功能。结论：逆转录病毒上清法可有效转染外源MDR1基因入骨髓造血细胞中；表达产物可行使正常生理功能；在转染4天时间内，转染率随转染时间延长而增高。

【关键词】多药耐药基因；转染；骨髓造血细胞；小鼠
【中国图书分类法分类号】R730.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-04-03

Research on the expression and function of MDR1 gene transferring into the murine hematopoietic cells of bone marrow

LI Yingcun ,et al
(General Surgery Department, Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】 *Objective*: Using retrovirus vector to transfer multidrug resistance gene(MDR1gene) into hematopoietic cells of murine bone marrow, and discussing the relation between transduction rate and the time. *Methods:* Supernatant method is used to transfer MDR1 gene into hematopoietic cells of murine bone marrow. PCR method is used to detect the gene integration. Immunohistochemistry(IC) method is used to measure the transduction rate. DNR extrusion test is used to measure the function of gene product. *Results:* Gene integration was tested by PCR method.The transduction rate is as high as 33%,and the rate of 4-day group is higher than that of 2-day group.The product of transferred gene has its physical function. *Conclusion:* Supernatant method is an effective way to transfer MDR1 gene into hematopoietic cells of murine bone marrow, and the product of MDR1 gene has its phsiological function. The transduction rate elevated following the prolonging of the transduction time during 4 days of transduction.

【Key words】MDR1 gene; Transfer; Hematopoietic cells; Murine

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的主要疾病之一。化疗是肿瘤治疗的重要手段，但在临床化疗实践中，恶性肿瘤对多种化疗药物的耐药，即多药耐药（MDR）及化疗对正常组织（如骨髓）的毒副作用常限制了化疗剂量的增大，影响化疗疗效[1]。研究发现，多药耐药基因（MDR1）产物P-gp过度表达是肿瘤产生MDR的最主要原因[2]。造血细胞对化疗药物高度敏感，大剂量、长时间化疗常使患者全血系下降，甚至因为出血及感染而死亡。这严重限制了临床化疗药物剂量的增大，影响临床化疗疗效。如果采用分子生物学方法把MDR1基因导入骨髓造血细胞，从而增强其化疗耐受作用，可使临床化疗药物剂量进一步增大，这无疑会增加肿瘤临床化疗疗效。我们意图采用含人MDR1全长序列cDNA的逆转录病毒载体转染小鼠骨髓造血细胞，进而检测其转染效率及有无功能性表达，从而为这种基因疗法应用于临床提供实验依据。

作者介绍：李英存（1974- ），助教、硕士，
主要研究方向：实体恶性肿瘤基因治疗。

1 材料与方法

1.1 材料

逆转录病毒载体包装细胞PA317-HaMDR1/A，由中科院天津血研所构建，测量病毒滴度为1.92×10^{6}CFU/ml。

Balb/c小鼠购自重庆医科大学动物实验中心。P-gp单克隆抗体JSB1及鼠组织专用SP-免疫组化试剂盒购自福州迈新生

维普资讯 http://www.cqvip.com

物技术开发公司。rmIL-3（PEPRO TECH.INC.UK）购于深圳晶美公司。EPO、IL-6、DNR、SCF购于北京邦定公司。

1.2 逆转录病毒上清法转染小鼠骨髓造血细胞

取逆转录病毒浓缩病毒上清与分离的小鼠骨髓单个核细胞共培养进行转染，取1ml培养体系，含细胞5×10^5，3% GLU 10μl，2-ME 5μl（10^{-4}M），EPO 20μl（50U/ml）、10%BSA 0.1ml，Polybrene 30μl（200μg/ml），rmIL-3 5μl（1000U/ml），h IL-6 10μl（20000U/ml），rmSCF 5μl（10μg/ml）。24孔板36℃，5%CO_2湿性孵育，隔日半量换液。转染按时间分为2日组及4日组。

1.3 PCR方法检测靶细胞基因插入

分别取转染组及未转染组小鼠骨髓单个核细胞，提取基因组DNA行PCR扩增，引物序列为正义5'-CCCATCATTGCAATAGCAGG，反义5'-GTTCAAACTTCTGCTCCTCA扩增产物加于8%聚丙烯酰胺垂直电泳，10%溴化乙锭显色，紫外灯观察。在157bp处出现扩增条带为阳性。

1.4 免疫组化法测定转染小鼠骨髓造血细胞转染效率

收集待检细胞，离心涂片，-20℃丙酮固定10min后，常规步骤进行免疫组化检测。结果判定：阳性反应为胞膜或胞浆染成棕色。每张涂片计数200个细胞，计算各级阳性细胞所占百分率。胞膜、胞浆内均无以应省为（-）、胞膜、胞浆内部分浅棕色者为（+），胞膜、胞浆内均浅棕色者为（++），胞膜、胞浆内深棕色者为（+++），胞膜有深棕色颗粒集结，胞浆内深棕色者为（++++）。

1.5 DNR排出试验检测P-gp功能

分别选取未转染组、转染2日组、转染4日组进行柔红霉素排出实验。结果判定：采用FACS Calibur检测仪，每个样品收集1万5千个细胞进行测定。

2 结 果

2.1 外源MDR1基因存在于靶细胞基因组中

根据中科院天津血研所结果[3]，以载有MDR1基因质粒作为模板，使用特异性MDR1基因引物序列可扩增出157bp单核苷酸链。本次实验结果证实，转染小鼠骨髓细胞基因组DNA扩增产物为marker147-190bp，接近157bp处有特异性扩增条带，而未转染组扩增后无此条带（见图1）。

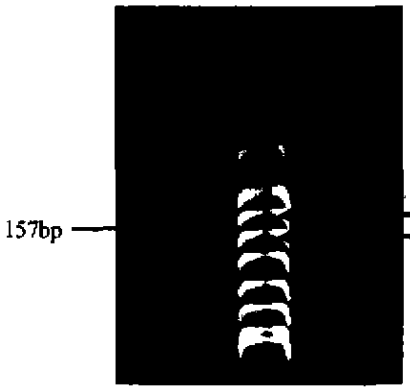


图1 MDR1基因PCR电泳图

2.2 MDR1基因转染效率测定

免疫组化法检测MDR1基因转染效率，结果如表1。

转染率计算为：实验组阳性细胞百分数－阴性对照阳性细胞百分数

2.3 不同时间转染效率比较

统计采用t检验，单侧$\alpha=0.05$，4日组MDR1转染率显著高于2日组MDR1基因转染率。

表1 细胞转染率测定

待测细胞	P-gp阳性等级(%)				转染率
	+	++	+++	++++	
未转染细胞	6	0	0	0	6%
转染2日组	10	11	0	0	15%
转染4日组	9	14	10	6	33%
PA371-HaMDR1/A	100	0	0	0	100%

表2 不同时间转染率比较

转染天数	X ± Sd	P
2日	13 ± 2	
4日	31.5 ± 1.5	<0.0005

表3 转染细胞P-gp功能检测

待测细胞	DNR泵出百分率
未转染细胞	1.50%
转染2日组	8.5%
转染4日组	31.5%

2.4 MDR1基因产物功能检测

为了验证转入靶细胞的外源MDR1基因产物P-gp是否具有正常功能，分别以未转染细胞、转染2日组细胞、转染4日组细胞作为研究对象，行柔红霉素排出试验，分设柔红霉素组及未加柔红霉素组，行流式细胞仪检测，实验结果如表3。

$$\text{细胞DNR阳性率}=\frac{DNR\text{阳性细胞数}}{\text{总细胞数}}\times100\%-\text{非特异性染色细胞}\%。$$

3 讨 论

人类恶性肿瘤因具有全身性及异质性特征，因此，化疗在临床肿瘤治疗中起着重要作用，但肿瘤的耐药常导致临床化疗失败。肿瘤的耐药机制较

维普资讯 http://www.cqvip.com

多，其中多药耐药（MDR1）基因过度表达是引起肿瘤耐药的最主要原因。我室在检测儿童实体恶性肿瘤MDR1基因表达中，MDR1mRNA阳性率为84.2%，P-gp阳性率为80%，两者符合率达86.7%[4]。MDR1基因在骨髓造血细胞中表达量极低[5]，导致其对化疗非常敏感，易受化疗药物攻击，导致全血细胞下降，这是化疗最严重的毒副作用。骨髓造血细胞MDR1基因低表达妨碍了化疗药物剂量的增大，影响化疗疗效。把MDR1基因转入骨髓造血细胞则可以提高骨髓造血细胞对化疗药物的耐受性。

国内外研究显示，小鼠骨髓细胞的MDR1基因转染率波动在7%～45%之间[6-8]，各学者所用转染方式及转染条件并不完全相同，主要分为与包装细胞共培养法及病毒上清转染法。本实验采用含MDR1基因的逆转录病毒上清转染法转染小鼠骨髓造血细胞，避免了包装细胞与转染细胞的混杂，提高了转染的安全性，PCR证实转染外源MDR1基因可整合入造血细胞基因组中，免疫组化法检测MDR1基因最高转染率达33%，较接近国外相同实验转染效率，高于国内相同实验，且转染的MDR1基因表达产物可行使正常功能，说明本实验所采用的病毒上清转染法适用于小鼠骨髓造血细胞转染。1998年，Bunting[9]采用造血细胞与细胞因子体外共培养12天后回输体内后，引起粒细胞增生紊乱，所以我们认为体外转染时间不应过长。本实验结果显示转染4日组小鼠骨髓造血细胞转染率高于2日组小鼠骨髓细胞转染率，转染效率达到应用水平，测定两组转染细胞死亡率无明显差别，说明逆转录病毒上清转染法结合半量换液有利于提高MDR1基因转染效率，转染4日组小鼠造血细胞更适合体内回输。本实验为进一步行MDR1基因疗法动物体内实验奠定了实验基础。

参 考 文 献

[1] Chaudhary PM, Roninson IB:Expression and activity of P-glycoprotein ,a multidrug efflux pump,in human hematopoietic stem cells[J].Cell,1991;66:85-94

[2] Flynn SD, Murren JR, Kirby WM, et al. P-glycoprotein expression and multidrug resistance in adrenocortical carcinoma [J].surgery, 1992;112(2):981-986.

[3] 刘炳仁，杨纯正，栾凤君，等. 用逆转录-多聚酶链反应检测白血病患者多药耐药基因的表达[J]. 中华血液学杂志，1995;16(2):65-68

[4] 王 珊，金先庆，杨纯正，等. 儿童实体恶性肿瘤多药耐药基因的表达[J]. 中华小儿外科杂志，1997;18(5):259-261

[5] Baccarani M, Damiani D, Michelutti A et al. Expression of multidrug resistance gene(MDR1) in normal hematopoietic cells [J]. Blood, 1993;81(12):3480-3481

[6] Sorrentino BP, Brandt SJ, Bodine D, et al. Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1[J].Science, 1992;257(3):99-103

[7] Kittler ELW, Peters SO, Crittenden RB, et al. Cytokine-facilitated transduction leads to low level engraftment in nonablated hosts[J]. Blood, 1997;90(2):865-872

[8] Licht T, Aksentijevich I, Gottesman MM, et al. Efficient expression of functional human MDR1 gene in murine bone marrow after retroviral transduction of purified hematopoietic stem cells[J].Blood, 1995;86(1):111-121

[9] Bunting KD, Galipeau J, Topham D, et al. Transduction of murine bone marrow cells with an MDR1 vector enables ex vivo stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice[J]. 1998;92 (7):2269-2279.

(上接第49页)

集界面细胞时，尽可能少吸取界下液体，否则，会夹杂Kupffer细胞。(5)无菌操作，由于整个分离时间较长，容易受细菌污染。因此、整个操作过程中，应严格按照无菌操作原则进行。

参 考 文 献

[1] Gressner AM. Mediator of hepatic fibrogenesis[J]. Hepatogastroenterology, 1996;43:92-103.

[2] Knook DL, Seffelaar AM, Deleeuw AM. Fat storing cells of the liver. Their isolation and purification[J]. Exp Cell Res, 1982; 139:468-471.

[3] 陈原稼，王宝恩，马雪梅，等. 大鼠贮脂细胞的分离及培养[J]. 肝脏病杂志，1993;1(1):17-20.

[4] Friedman SL, Rockey DC, Mcguire RF, et al. Isolation of Lipocytes and Kupffer cells from normal humun liver: Morphological and functional characteristics in primary culture[J]. Hepatology, 1992;15:234-243.

[5] 徐列明，刘 成，刘 平，等. 一种稳定和高产的肝贮脂细胞分离法[J]. 细胞生物学杂志，1995;17(3):143-145.

[6] 汪 谦，夏穗生，姜汉英，等. 大鼠肝细胞、Kupffer和Ito细胞的分离与培养[J]. 中华实验外科杂志，1994; 11(2):72-73.